

TRANSFORMATIONS ALLOGÈNES DU PNEUMOCOQUE

HARRIETT EPHRUSSI-TAYLOR

avec la collaboration technique de Mme. L. GOLDSTEIN

Institut de Génétique du C. N. R. S. et Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, France

Reçu le 3 Février, 1951

LORSQU'ON fait agir, dans des conditions qui seront rappelées plus bas, un extrait de pneumocoques à capsule sur une culture de pneumocoques sans capsule, on y induit l'apparition de bactéries semblables à celles de la souche utilisée pour la préparation de l'extrait. Ces expériences, réalisées par Griffith (4) et Avery, MacLeod et McCarty (1), montrent que chaque type de pneumocoque à capsule renferme un agent responsable de la formation et de la spécificité du polysaccharide capsulaire. L'étude chimique de ces agents (« transforming principles » ou « TP » de Avery) indique qu'ils sont composés uniquement d'acide désoxyribonucléique (ADN). Leurs propriétés biologiques suggèrent d'autre part qu'ils représentent des unités génétiques, responsables de leur propre propagation dans la bactérie, aussi bien que de la formation d'un polysaccharide capsulaire spécifique. On reconnaît, à l'heure actuelle, plus de 70 types différents d'antigènes capsulaires et il faut supposer qu'il y a autant de TP spécifiques, bien qu'on n'en ait isolé que trois sous forme purifiée (11).

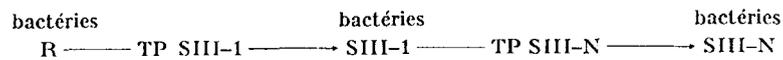
La diversité des types de pneumocoques peut être attribuée à des mutations du TP au cours de l'évolution. Cependant on n'a jamais enregistré dans les conditions expérimentales l'apparition d'une mutation conduisant à la formation d'un nouveau polysaccharide.

Les nombreux mutants observés chez les pneumocoques de plusieurs types sont caractérisés par des modifications *quantitatives*. Des mutants à capsule réduite on a pu extraire des TP capables d'induire chez les pneumocoques sans capsule la formation d'une capsule semblable à celle de la souche qui a fourni le TP. Chacun de ces mutants contient donc un TP muté. Quoique ces mutations du TP ne se manifestent au niveau du phénotype que par des changements apparemment quantitatifs, tout changement de l'activité biologique d'un TP relève nécessairement d'une altération de sa structure dont les détails inconnus seraient intéressants à connaître. Ce sont ces considérations qui nous ont conduit à poursuivre l'étude des TP mutés commencée il y a quelques années et dont, en guise d'introduction, il est utile de rappeler ici l'essentiel.

Notre étude porte sur des mutants du pneumocoque du Type III. Tous les mutants étudiés appartiennent à l'une de deux classes distinctes, caractérisées par le degré de réduction de la synthèse capsulaire (15). Nous les appellerons SIII-1 et SIII-2 (voir tableau I). La capsule des bactéries de la classe SIII-1 est si réduite que celles-ci ne se comportent pas, dans les réactions sérologiques classiques, comme des bactéries à capsule typiques. Les bactéries SIII-2 possèdent au contraire une véritable capsule, mais celle-ci est encore considérablement réduite par comparaison avec la capsule des pneumocoques normaux (SIII-N).

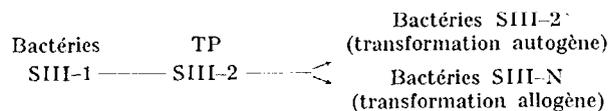
La présence d'une capsule complète semble constituer une entrave à la transformation d'une bactérie. C'est pourquoi nous ne pourrions étudier que les transformations des pneumocoques sans capsule (R) et des pneumocoques SIII-1 qui ne secrètent qu'une capsule rudimentaire.

Il est possible de réaliser en deux étapes la transformation suivante:



et on peut montrer que les bactéries SIII-N ainsi produites ne renferment que l'agent capsulaire SIII-N. Ceci conduit à la conclusion qu'un pneumocoque ne peut contenir qu'un seul TP capsulaire, et que l'agent SIII-1 est remplacé au cours de la deuxième étape par l'agent normal, inducteur de la deuxième transformation (15).

Tandis que le phénomène décrit suggère que la transformation consiste en un remplacement de l'agent contenu dans la bactérie par l'agent introduit sous forme purifiée dans le milieu de culture, les résultats d'autres expériences ne sont pas compatibles avec une telle interprétation. Ainsi, la souche SIII-1 transformée par le TP de la souche SIII-2 donne deux sortes de bactéries: des pneumocoques SIII-2, entièrement semblables aux bactéries qui ont fourni le TP, et des pneumocoques SIII-N, à capsule normale. Ces derniers ont un phénotype qui ne correspond ni au TP de la souche soumise à l'action du TP, ni à celui de la souche ayant fourni celui-ci. On peut donc distinguer dans ce cas deux sortes d'activités du TP SIII-2: une *action autogène*, qui donne naissance aux bactéries SIII-2, et une *action allogène*, qui est à l'origine des bactéries à phénotype nouveau. Cette double transformation peut être représentée par le schéma suivant:



L'activité autogène peut bien s'expliquer par un simple remplacement du TP SIII-1 par le TP SIII-2. L'activité allogène requiert au contraire une autre explication et nous a conduit à supposer que les transformations allogènes sont dues à la reconstitution d'un agent transformant normal à partir des deux agents mutés: celui se trouvant dans les pneumocoques (SIII-1) et celui introduit dans le milieu de culture (SIII-2).

On verra que le présent travail, qui porte sur plusieurs sortes de transformations allogènes, fournit des données en faveur d'une telle interprétation et montre que les nouveaux agents, résultats des transformations allogènes, peuvent être soit normaux, soit mutés, selon les propriétés spécifiques des deux agents impliqués dans leurs formation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches de pneumocoques. La plupart des souches employées dans ce travail sont les mêmes que celles qui ont servi dans les études des transformations induites réalisées au laboratoire de Avery, à l'Institut Rockefeller de New York. Certaines autres sont des lignées mutantes isolées à partir des souches de Avery. La liste complète comporte, outre les races indiquées dans le tableau I, la souche R36A, lignée « rough »

TABLEAU I

Liste des souches de Pneumocoques normaux et mutés Type III.

	Phénotype		
	SIII-1 (mutée)	SIII-2 (mutée)	SIII-N (normale)
Morphologie coloniale	« rough »	« smooth »	« smooth » (mucoïde)
Formation de précipitine du type III ..	+	+++	++++
Réaction de Neufeld	—	+	+
Antigènes somatiques.....	exposés	couverts	couverts
Souches.....	SIII-1 ³ SIII-1a ¹ SIII-1b ¹ SIII-1c ²	SIII-1 ³	A66 SV-III

Origine des mutants:

¹ Mutation spontanée de A66.

² Mutation spontanée de SV-III.

³ Mutation spontanée de l'agent transformant de la souche A66, pendant ou après la transformation de la souche sans capsule, R36A (voir Taylor, 1949).

dérivée de la souche à capsule du Type II, D39. On trouvera dans le tableau l'origine de chaque souche, aussi bien que ses propriétés sérologiques. En ce qui concerne ces dernières, on se rappellera que les souches qui ont une véritable capsule ne sont pas agglutinées par les anticorps dirigés contre les antigènes somatiques. Ainsi, les souches SIII-N et SIII-2 ne sont agglutinées que par des anticorps contre le polysaccharide capsulaire du Type III. Les souches de la catégorie SIII-1 sont, au contraire, agglutinées par des immunserums anti-rough ou anti-Type III smooth, ce qui indique que la surface de ces bactéries n'est pas entièrement couverte par une couche de polysaccharide capsulaire. On se rappellera d'autre part que le polysaccharide capsulaire des pneumocoques est soluble dans l'eau. En conséquence, l'agglutination des souches qui en font une sécrétion active n'a lieu qu'en présence de grandes quantités d'anticorps spécifiques, une partie de ces derniers étant neutralisée par le polysaccharide en solution. Les titrations d'agglutination des divers mutants montrent que, plus la sécrétion capsulaire est réduite, plus les anticorps capsulaires sont efficaces.

Le groupement de plusieurs souches mutantes dans la même catégorie SIII-1 est justifié par des titrations d'agglutination identiques. Il est bien entendu que l'on ne peut considérer les quantités de polysaccharide formées par les divers mutants comme semblables qu'aux erreurs près de la méthode de titration utilisée. La méthode employée ne permettrait évidemment pas de déceler de très faibles différences entre les quantités de polysaccharides capsulaires de ces diverses souches.

On ignore à l'heure actuelle si les pneumocoques SIII-1 et SIII-2 synthétisent des polysaccharides strictement identiques au polysaccharide du Type III normal et par conséquent si la synthèse de polysaccharide par ces mutants est affectée qualitativement aussi bien que quantitativement. Des données décrites dans une publication antérieure ont rendu peu probable l'existence de différences qualitatives, mais la question ne pourra être considérée comme résolue tant qu'un travail beaucoup plus étendu n'aura pas été effectué. Récemment, nous avons isolé une petite quantité de polysaccharide de la souche SIII-2. Ce polysaccharide permet de précipiter tous les anticorps du Type III d'un immunserum anti-SIII-N. Ce fait exclut l'existence d'une différence de structure entre ce polysaccharide et celui de la souche normale SIII-N, mais n'exclut pas l'existence des différences dans le degré de polymérisation des deux polysaccharides en question.

Milieus. Deux milieux liquides et un milieu solide sont employés dans ces études.

1) Pour isoler les agents transformants à partir des diverses souches, les pneumocoques sont cultivés dans le milieu suivant:

30 g neopeptone (Difco), 12 g d'extrait de levure (Difco), 26 g Cl Na et 3 litres d'eau distillée.

Cette quantité de milieu est répartie dans deux fioles de 3 litres, et stérilisée à 120° C. pendant 30 minutes. Au moment de l'ensemencement des cultures, 1 cm³ d'une solution stérile de glucose à 25 p. 100 est ajouté à chaque fiole.

2) Pour l'étude de la morphologie coloniale, ce même milieu additionné de gélose sert comme base d'un milieu solide à sang de lapin. La concentration de glucose est doublée. Avant de verser le milieu dans les boîtes Petri, le milieu gélosé fondu est refroidi à 45° C. et additionné de 2,5 p. 100 de sang de lapin défibriné.

3) Pour le maintien des souches et pour les études des transformations, un milieu plus complexe est requis. Ce milieu, également à base de neopeptone et d'extrait de levure, contient de plus un extrait de sérum de bœuf préparé comme suit:

Du sang entier est recueilli dans des bouteilles vaselinées. Après la formation du caillot, le sérum est décanté et additionné d'un volume égal d'eau distillée. Le mélange est chauffé dans un bain-marie à 90° C. pendant 25 à 30 minutes. On sépare alors les protéines coagulées par filtration sur un grand Buchner. Afin de précipiter davantage les protéines dénaturées, le liquide trouble est acidifié avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 5. Le précipité qui se forme est séparé par filtration sur du « Filter Cel » (kaolin). Le pH est ensuite ramené à 7-7.2. L'extrait est réparti dans des flacons et stérilisé pendant 20 minutes à 120° C. Cet extrait peut être gardé au moins un an sans perdre son activité.

Le milieu 3 a la composition suivante:

100 cc extrait de sérum de bœuf, 10 g neopeptone, 4,3 g PO₄ HNa₂, 0,26 g PO₄ H₂K, 0,25 g SO₄ Mg, 0,010 g Cl₂ Ca, 3,0 g ClK, 1 litre d'eau distillée.

La solution subit un traitement avec 10 g de charbon, à pH 3. Le pH est ensuite ramené à 7,6 et le milieu est autoclavé pendant 20 minutes à 120° C. Il se forme un précipité qui est enlevé par filtration. Des quantités mesurées du milieu sont distribuées dans des fioles et stérilisées à 120° C. pendant 20 minutes. Il se forme toujours un deuxième précipité qui se dissout au bout de quelques jours. Avant l'emploi, on ajoute, pour 100 cm³ de milieu, 0,1 cm³ de glucose à 25 p. 100 stérile et 4 cm³ d'une solution d'extrait de levure à 10 p. 100, préalablement traitée avec du charbon à pH 3 et stérilisée par filtration.

Dans ce milieu, la population maxima est d'environ 10⁸ pneumocoques par cm³; la durée de génération est de 28 minutes à 37° C. pour la souche R36A. La croissance est limitée par le glucose, dont la concentration ne permet pas la baisse du pH au-dessous de 6,7.

Technique des transformations. Les détails de la technique des transformations ont été décrits antérieurement (15). Rappelons simplement que les transformations ont lieu dans des cultures en pleine croissance, en présence de substances accessoires (12) et d'un agent transformant.

La préparation des agents transformants. La technique de préparation des agents transformants employée ici est essentiellement celle décrite par MacLeod et Krauss (10). Elle consiste à obtenir une très forte croissance dans un volume limité de milieu nutritif et à la faire suivre par la lyse des bactéries dans le milieu de culture même. Après la lyse induite par du désoxycholate de sodium en présence de citrate de sodium (11), l'acide nucléique est précipité par l'alcool. Le précipité est remis en solution et déprotéinisé. L'extrait bactérien déprotéinisé subit alors un fractionnement selon une nouvelle technique qui permet la séparation de la grande partie, sinon de la totalité, de l'acide ribonucléique dans une première fraction, de l'acide désoxyribonucléique dans une seconde et du polysaccharide capsulaire dans une troisième. Les détails de ce fractionnement seront résumés plus bas. Les étapes de la préparation d'un agent transformant seront résumées d'abord.

1) On prépare une culture dans le milieu 1, ensemencé avec des bactéries jeunes ayant proliféré dans le milieu 3 additionné d'un peu de sang de lapin.

2) Le lendemain, on ajoute à cette culture 35 cm³ de glucose et du rouge de phénol.

TABLEAU II

Propriétés des trois fractions des extraits bactériens déprotéinisés.

	Fraction A	Fraction B	Fraction C
Viscosité	faible	forte	forte
Réactions:			
de Bial	très forte	faible	
de Dische	faible ou absente	forte	faible
avec les anticorps du Type III	négative	positive ¹	très forte ¹
Maximum d'absorption	258 m μ forte	258-260 m μ forte	258-260 m μ faible
Principal constituant	acide ribonucléique	acide désoxyribonucléique	polysaccharide

La croissance reprend et l'acide produit est neutralisé, au fur et à mesure de sa formation, par addition de NaOH 1 N. Au bout de 3 à 4 heures, ce qui correspond à l'addition de 75 cm³ de soude, la population s'élève à $2,5 \times 10^{10}$ bactéries par cm³.

3) On ajoute alors du citrate de sodium pour rendre le milieu 0,1 normal, puis on induit la lyse par addition de 10 cm³ d'une solution de désoxycholate de sodium à 10 p. 100 par litre de milieu. La lyse, effectuée à 37° C., est complète en 15 minutes.

4) Aussitôt après la lyse, on ajoute lentement 0,55 volumes d'alcool, tout en agitant le milieu. Quelquefois l'acide nucléique se précipite sous forme de fibres que l'on peut enrouler sur un agitateur. Plus souvent le précipité est recueilli par centrifugation.

5) Le précipité est suspendu dans 100-200 cm³ de NaCl à 0,85 p. 100 et les protéines sont séparées par la technique de Sevag (13). Cette étape est considérablement facilitée par l'addition à la suspension, au cours des premières extractions, de quelques gouttes de désoxycholate de sodium à 10 p. 100. Après 6 à 10 traitements par le chloroforme et l'alcool amylique on ne peut d'habitude plus extraire de protéines. La solution limpide et visqueuse est alors additionnée de MgCl₂ jusqu'à une concentration finale de 1 p. 100 pour effectuer le fractionnement à l'alcool éthylique. Celui-ci est ajouté goutte à goutte pendant qu'on remue vigoureusement.

Lorsque la concentration d'alcool atteint 20 p. 100, la solution se trouble, puis un précipité se forme lentement. Après 24 heures à froid, on sépare celui-ci par centrifugation à 3 000 tours pendant 30 minutes. Il constitue la fraction A.

La fraction suivante est obtenue en portant la concentration d'alcool à 26 p. 100 (0,35 volumes d'alcool ajouté): des fibres se séparent brusquement. On les enroule immédiatement sur un agitateur (Fraction B).

Enfin, à cette même concentration d'alcool, on voit se former plus lentement un

¹ Pour les préparations faites à partir des souches Type III.

précipité floconneux qui correspond à la grande partie du polysaccharide capsulaire (Fraction C). Les vitesses différentes de formation des deux précipités, ainsi que la nature physique différente de ceux-ci, permettent la séparation de l'acide désoxyribonucléique du gros de polysaccharide.

Jusqu'ici les fractionnements ont été pratiqués sur de petites quantités de matériel et l'étude détaillée de la composition de chaque fraction n'a pas été entreprise. Toutes les données recueillies à ce sujet sont résumées dans le tableau II. On peut dire en plus que la fraction A, qui renferme de l'acide ribonucléique, peut être rendue entièrement négative à la réaction de Dische (pour le désoxyribose) par une deuxième précipitation. La forte absorption de l'acide ribonucléique à 258 m μ a permis de constater dans une expérience que 93 p. 100 de la substance absorbante ne dialyse pas. Néanmoins, il est très probable que, contrairement à l'acide désoxyribonucléique, l'acide ribonucléique est dépolymérisé pendant la lyse et on peut se demander si le succès du fractionnement ne repose pas sur cette différence dans l'état de polymérisation.

La méthode de séparation des deux acides nucléiques qui vient d'être décrite est plus douce que les méthodes couramment employées, mais la pureté des deux fractions reste à déterminer (1).

Lorsqu'il s'agit de préparations faites à partir de pneumocoques du Type III, la fraction B, qui contient la presque totalité de l'acide désoxyribonucléique, donne une réaction sérologique due à la présence de polysaccharide capsulaire. On peut la débarrasser de toute activité sérologique en répétant le fractionnement 4 ou 5 fois, mais on perd toujours un peu d'acide désoxyribonucléique. C'est pourquoi nous n'avons d'habitude pas purifié de cette façon les extraits employés au cours du présent travail.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I.—*Les diverses transformations allogènes.* Les expériences suivantes ont été entreprises pour savoir si l'interaction entre toute paire de TP mutés peut conduire à une transformation allogène. Des isolements des TP capsulaires ayant été effectués à partir de chacune des souches énumérées dans le tableau I, nous avons testé l'activité de chacun de ces agents sur toutes les souches capables d'être transformées. Le tableau III résume les résultats obtenus. Il en ressort que:

1) Une souche ne donne jamais de transformation sous l'influence du TP isolé à partir d'elle-même.

2) Plusieurs souches à TP capsulaire muté donnent des transformations allogènes lorsqu'elles sont traitées par un autre TP muté (cas indiqués en caractères gras dans le tableau III).

3) Les TP SIII-1, SIII-1a et SIII-1c, qui proviennent de souches phénotypiquement semblables, ont des activités transformantes nettement différentes et doivent par conséquent être considérés comme différents. Il faut supposer que chacun de ces agents a muté d'une façon particulière.

TABLEAU III

Activité transformante des acides désoxyribonucléiques isolés à partir des souches du Type III sur les diverses souches à phénotype SIII-1 et la souche sans capsule, R36A. Les transformations allogènes sont inscrites en caractères gras. 0 indique l'absence de transformation.

Souche traitée	TP dans les bactéries	Formes induites sous l'action du TP					
		SIII-1	SIII-1a	SIII-1b	SIII-1c	SIII-2	SIII-N
R36A	?	SIII-1	SIII-1a	SIII-1b	SIII-1c	SIII-2	SIII-N
SIII-1	SIII-1	0	SIII-2	SIII-2	SIII-N	SIII-2 et SIII-N	SIII-N
SIII-1a	SIII-1a	SIII-2	0	0	SIII-N	SIII-2 et SIII-N	SIII-N
SIII-1b	SIII-1b	SIII-2	0	0	SIII-N	SIII-2 et SIII-N	SIII-N
SIII-1c	SIII-1c	SIII-N	SIII-N	SIII-N	0	SIII-2 et SIII-N	SIII-N

4) Seuls les TP SIII-1a et SIII-1b paraissent être identiques au point de vue de leur activité transformante. On peut donc supposer que les souches SIII-1a et SIII-1b contiennent des agents transformants mutés de la même manière. Ceci revient à admettre que la même mutation spontanée a été décelée deux fois.

5) Des transformations réciproques donnent le même résultat. Par exemple, la transformation de la souche SIII-1 par le TP SIII-1a, aussi bien que la transformation de la souche SIII-1a par le TP SIII-1, donnent lieu à l'apparition de pneumocoques à phénotype SIII-2.

6) Le fait que les transformations allogènes ne se limitent pas à la formation de pneumocoques SIII-N est également digne de remarque. Les transformations qui aboutissent à la formation de pneumocoques SIII-2 ne sont que des restitutions partielles du pouvoir de sécrétion du polysaccharide.

7) Enfin, on voit que le TP SIII-2 induit dans toutes les souches SIII-1 à la fois des transformations autogènes (en SIII-2) et des transformations allogènes (en SIII-N). On peut donc se demander si le TP SIII-2 n'a pas

une activité très particulière qui le distingue des TP SIII-1, SIII-1a. Ces derniers induisent en effet, dans les souches SIII-1, seulement des transformations allogènes. Cependant, il est évident que la transformation autogène d'une souche SIII-1 par l'agent d'une autre souche à phénotype SIII-1 ne serait pas décelable par le simple examen de la morphologie coloniale. Il est tout à fait possible que les transformations allogènes sont toujours accompagnées de transformations autogènes, mais que celles-ci échappent à l'observation car le phénotype des bactéries ayant subi cette sorte de transformation se confond avec celui des bactéries non transformées.

Cette première série d'expériences soulève trois questions qui seront abordées maintenant.

II.—Fréquence des transformations allogènes. On peut se demander si les diverses transformations allogènes se produisent avec des fréquences identiques. L'étude précise de ce problème requiert la mise au point de méthodes nouvelles. Cependant, quelques expériences préliminaires montrent dès à présent que les fréquences des diverses transformations allogènes d'une même lignée sont extrêmement différentes et dépendent du TP employé pour induire la transformation.

Dès le début de la présente étude, il nous est paru évident que les transformations allogènes qui donnent naissance aux bactéries SIII-2 sont des événements beaucoup plus rares que toutes les autres transformations rencontrées. Afin de nous en assurer d'une façon plus objective, des titrations de l'activité transformante de deux TP ont été entreprises. Le tableau IV présente les résultats de ces titrations faites dans des conditions standard. Les titrations A et B ont été effectuées le même jour avec la même culture SIII-1, et la titration C quelques jours plus tard. La titration A montre qu'au moment de l'expérience, la souche SIII-1 était très susceptible d'être transformée par les TP SIII-1c. La titration B indique qu'au même moment cette souche ne donnait que très difficilement des transformations allogènes (en SIII-2) sous l'influence de TP SIII-1a. Ceci ne peut être attribué à l'inactivité du TP SIII-1a, car celui-ci s'est montré très actif dans son action sur une souche différente (SIII-1c) pour donner des transformations en SIII-N (titration C). Il apparaît donc que les transformations allogènes en SIII-N sont beaucoup plus fréquentes que celles en SIII-2. Cette conclusion est confirmée par d'autres transformations allogènes en SIII-2.

Ces premiers résultats semi-quantitatifs suggèrent que les fréquences des transformations allogènes dépendent dans une large mesure des propriétés des paires de TP.

TABLEAU IV

Titration de l'activité transformante des acides désoxyribonucléiques extraits à partir des souches SIII-1c et SIII-1a et agissant sur les souches SIII-1 et SIII-1c. Après 24 heures d'incubation, une fraction de la culture traitée est étalée sur milieu gélosé. Les colonies à phénotype nouveau sont recherchées. 0: absence d'induction. +: les formes induites ne représentent qu'une faible partie de la population. Les cultures témoins incubées sans acide nucléique sont dans tous les cas des cultures pures de la souche ensemencée.

Souche traitée	Tests quintuples	µg d'ADN de la souche SIII-1c par cm ³						
		0,1	0,01	0,0033	0,001	0,00033		
A SIII-1	a	SIII-N	SIII-N	SIII-N	SIII-N ⁺	SIII-N ⁺		
	b	SIII-N	SIII-N	SIII-N	SIII-N ⁺	0		
	c	SIII-N	SIII-N	SIII-N	SIII-N	0		
	d	SIII-N	SIII-N	SIII-N	SIII-N ⁺	0		
	e	SIII-N	SIII-N	SIII-N	SIII-N	0		
		µg d'ADN de la souche SIII-1a par cm ³						
		28	2,8	0,28	0,028	0,0093	0,0028	0,00093
B SIII-1	a	0	0					
	b	0	0					
	c	0	0					
	d	0	0					
	e	SIII-2 ⁺	0					
C SIII-1c	a			SIII-N	SIII-N	SIII-N	0	SIII-N
	b			SIII-N	SIII-N	SIII-N	0	SIII-N
	c			SIII-N	SIII-N	SIII-N	SIII-N	0
	d			SIII-N	SIII-N	SIII-N	SIII-N	0
	e			SIII-N	SIII-N	SIII-N	SIII-N	0

III.—*Non-identité des TP SIII-2 et SIII-2a.* On pouvait se demander si des bactéries à phénotype SIII-2 apparues au cours d'une transformation allogène sont identiques avec les bactéries de la souche SIII-2 qui doit son origine à une mutation spontanée.

Nous avons étudié l'agglutination, par les anticorps du Type III, de deux clones, SIII-2a et SIII-2b provenant de transformations allogènes, et de la souche SIII-2 originale. Les résultats des titrations d'agglutination donnés dans le tableau V indiquent que les trois souches comparées secrètent approximativement la même quantité de polysaccharide capsulaire. Aucune de ces souches n'est agglutinée par un immunserum antirough.

TABLEAU V

Agglutination des souches SIII-2, SIII-2a et SIII-2b par un immunserum du Type III. 10⁸ bactéries sont ensemencées dans le milieu nutritif qui renferme la quantité indiquée de sérum. Période d'incubation: 20 heures. La souche SIII-2a provient d'une transformation de la souche SIII-1a par le TP SIII-1; la souche SIII-2b d'une transformation de la lignée SIII-1b par le même agent transformant.

Souche ensemencée	Dilution de l'immunserum de cheval, anti-Type III							Témoin
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	
SIII-2	+++	+++	++	+	—	—	—	—
SIII-2a	+++	+++	++	+	—	—	—	—
SIII-2b	+++	+++	++	+	—	—	—	—

+++ : les bactéries sont presque entièrement sédimentées.

++ : petits sédiments, grumeaux en suspension.

+: grumeaux en suspension.

—: pas d'agglutination.

TABLEAU VI

Test qualitatif de l'activité transformante d'un extrait de bactéries SIII-2a sur les souches SIII-1, SIII-1a, SIII-1b et SIII-1c.

Souche ensemencée	TP	Tests quadruples				Témoin sans TP
		1	2	3	4	
SIII-1		SIII-2	SIII-2	SIII-2	SIII-2	SIII-1
SIII-1a	SIII-2a	SIII-2	SIII-2	SIII-2	SIII-2	SIII-1a
SIII-1b		SIII-2	SIII-2	SIII-2	SIII-2	SIII-1b
SIII-1c		{ SIII-2 SIII-N	{ SIII-2 SIII-N	{ SIII-2 SIII-N	{ SIII-2 SIII-N	SIII-1c

Les méthodes d'agglutination ne permettent donc pas une différenciation de ces lignées.

Toujours en vue de trouver des différences entre les souches SIII-2 et SIII-2a, nous avons étudié l'activité du TP isolé de cette dernière. On se souvient que la transformation des souches SIII-2 n'a jamais pu être effectuée (14, 15). Par conséquent, un test direct de l'activité transformante du TP SIII-2a sur des pneumocoques SIII-2 n'a pas pu être fait. Des expériences de transformation à l'aide de ce TP de bactéries de la classe SIII-1 montrent que le TP SIII-2a diffère du TP SIII-2. Le TP SIII-2 induit dans toutes les lignées à phénotype SIII-1 à la fois des transformations allogènes et autogènes. Or, comme le montre le tableau VI, le TP SIII-2a n'induit

des transformations allogènes que dans la souche SIII-1c. Dans toutes les autres, son activité se borne aux transformations autogènes.

Ainsi, le TP SIII-2a est distinct du TP SIII-2 et on peut se demander si ses propriétés ne reflètent pas son origine. La lignée SIII-2a provient d'une transformation de la souche SIII-1a par le TP SIII-1. Contiendrait-elle les TP de ces deux lignées? Ceci ne nous paraît pas très probable pour les raisons suivantes:

1) En agissant sur la lignée R36A, le TP SIII-2a induit l'apparition de bactéries SIII-2 avec une fréquence relativement grande. Or, s'il était un mélange des TP SIII-1 et SIII-1a, les transformations en SIII-2 devraient être extrêmement rares, car elles requerraient l'intervention simultanée de ces deux TP.

2) De même, en agissant sur les lignées SIII-1, SIII-1a et SIII-1b, ce TP induit constamment des transformations en SIII-2. Or; si le TP SIII-2 était un mélange des TP SIII-1 et SIII-1a, ces transformations devraient être très rares, comme toutes les transformations allogènes en SIII-2.

3) En agissant sur la lignée SIII-1c, le TP SIII-2a induit constamment des transformations en SIII-2 et SIII-N. Or, si cet agent était un mélange des TP SIII-1 et SIII-1a, un tel résultat serait très improbable; chacun de ces TP, lorsqu'ils agissent sur SIII-1c, induisent en effet des transformations en SIII-N. On s'attendrait donc plutôt à ce qu'un mélange des TP SIII-1 et SIII-1a induise également des transformations en SIII-N lorsqu'il agit sur SIII-1c.

Il paraît par conséquent plus probable qu'au cours de la transformation qui a donné naissance à la souche SIII-2a, il s'est formé un nouvel agent transformant (SIII-2a).

IV.—Nature de la transformation allogène en SIII-N. La formation, dans certaines transformations allogènes, de bactéries à phénotype SIII-N, pose des problèmes tout à fait analogues à ceux posés par l'origine de la souche SIII-2a. Ici encore le phénotype SIII-N pourrait être dû soit à ce que les bactéries SIII-N renferment deux TP mutés dont l'action combinée rétablit la sécrétion normale de polysaccharide, soit à ce qu'un agent capsulaire SIII-N a été reconstitué à partir de deux agents mutés. Quoique la première hypothèse paraisse peu probable à la suite de l'étude de l'agent SIII-2a, nous avons, à titre de vérification, étudié l'agent capsulaire d'une lignée SIII-N résultant d'une transformation allogène.

Une lignée SIII-N apparue dans une expérience de transformation de la souche SIII-1a par l'agent transformant SIII-2 a été choisie pour cette étude.

Ce choix a été gouverné par les considérations suivantes. Les bactéries SIII-2 forment des colonies très nettement distinctes des colonies R ou SIII-1. Par conséquent, la présence de l'agent SIII-2 dans l'acide nucléique de la souche allogène SIII-N serait facilement décelée sans l'application de techniques spéciales.

Un clone de bactérie SIII-1a a été traité par le TP SIII-2. Comme toujours, ce traitement a abouti à la formation de pneumocoques SIII-2 et SIII-N. Une colonie SIII-N a été isolée et a fondé le clone qui a servi à l'isolement de l'acide désoxyribonucléique. L'activité transformante de cette substance a été testée sur les souches R36A et SIII-1. Des pneumocoques SIII-2 ne sont apparues dans aucun cas. La préparation utilisée s'est donc comportée comme toute préparation obtenue à partir de pneumocoques SIII-N. Elle paraît par conséquent renfermer seulement un agent transformant capsulaire normal.

Ainsi, les résultats de nos expériences suggèrent que les transformations allogènes résultent de la reconstitution d'un agent capsulaire normal ou muté à partir de deux agents capsulaires mutés différents, le degré de reconstitution dépendant des propriétés spécifiques des deux agents qui ont participé à la reconstitution.

DISCUSSION

On sait que la réduction de la capsule chez certains mutants du pneumocoque est le résultat de la mutation spontanée de l'agent capsulaire (TP) qu'ils contiennent (10, 14, 15). Nous venons de montrer que, lorsque des pneumocoques qui contiennent un TP muté sont traités par un TP muté différent, on observe des transformations allogènes, c'est-à-dire l'apparition de bactéries à synthèse capsulaire entièrement ou partiellement rétablie, selon la paire de TP confrontés. Les expériences qui viennent d'être décrites montrent que cette restitution intéresse non seulement le phénotype de la bactérie, mais aussi son TP. Ainsi, lorsqu'une transformation allogène aboutit à la synthèse capsulaire normale, on trouve dans la bactérie un TP normal. Lorsque, au contraire, elle a pour résultat la restitution partielle de la synthèse capsulaire, on trouve dans la bactérie un TP nouveau, qui ne peut induire dans une bactérie « rough » que la formation d'une capsule réduite. Autrement dit, tout se passe comme si le TP de la bactérie mutée était plus ou moins « normalisé » sous l'action du TP, également muté, introduit dans le milieu. Quelle que soit la paire de TP donnant naissance à un TP normal, sa formation est un événement relative-

ment fréquent. La formation d'un TP partiellement restitué est, au contraire, un événement rare.

Les transformations allogènes ressemblent incontestablement aux recombinaisons décrites chez les bactériophages et le virus de l'influenza (2, 3, 5, 6, 8, 9). Ces recombinaisons ont lieu quand une cellule est infectée simultanément par deux virus différents, mais étroitement apparentés. En fait, le cas le plus étudié est celui d'une série de bactériophages mutés, dérivés de la lignée T2 (5, 6). Trois sortes de recombinaisons ont été reconnues:

a—Formation de particules de virus ayant des caractères spécifiques des deux souches infectantes (2, 3, 5, 6).

b—Formation de virus normal à partir de deux particules de virus inactivés par irradiation (8, 9).

c—Formation de virus normal à partir de paires de souches présentant le même caractère muté et devant leur origine à des mutations spontanées indépendantes au sein de la même souche. Il s'agit dans ce cas des mutations *r* (lyse rapide des bactéries infectées) du bactériophage T2. Quatorze mutants indépendants ont été étudiés. Une bactérie infectée par n'importe quelle paire de ces mutants peut donner un virus normal, mais la fréquence des recombinaisons dépend de la paire employée (5, 6).

Les recombinaisons de cette dernière sorte semblent présenter une analogie frappante avec les interactions entre TP au cours des transformations allogènes et il est tentant de chercher une base commune aux deux phénomènes. Dans ce qui suit, nous recommencerons par rappeler les hypothèses proposées pour l'explication des recombinaisons chez les virus; nous examinerons ensuite la possibilité d'appliquer ces hypothèses aux transformations allogènes.

Les hypothèses de Luria (8, 9) et de Hershey et Rotman (5, 6) ont en commun un postulat important, à savoir que le bactériophage est composé de plusieurs éléments génétiques distincts. Les auteurs cités admettent que les recombinaisons observées dans les bactéries infectées simultanément par plus d'une sorte de phage sont dues à des réassociations des éléments génétiques de deux particules de virus différents.

Les recombinaisons du type *a* sont expliquées par cette théorie sans autre hypothèse. Les recombinaisons du type *b* s'expliquent si l'on suppose que chacune des deux particules irradiées contient une mutation létale différente. Enfin, les recombinaisons *c* s'expliquent si l'on admet que le phénotype *r* est dû, dans chacune des lignées examinées, à la mutation d'un locus différent.

Ces hypothèses ressemblent beaucoup à la théorie du crossing-over des chromosomes dont les auteurs se sont inspirés et sont plausibles surtout parce que le bactériophage est relativement grand et doué de propriétés biologiques variées: on connaît des mutations qui affectent la nature de la lyse, la capacité d'être adsorbé par un hôte donné, l'exigence des facteurs accessoires pour l'adsorption par la bactérie et la stabilité à la chaleur. Ainsi l'hypothèse selon laquelle les bactériophages sont composés de plusieurs gènes cadre bien avec les conceptions actuelles de l'étroite spécificité des gènes.

On peut se demander si une théorie analogue peut rendre compte des transformations allogènes. Ceci ne paraît pas facile pour les raisons suivantes:

1—Les TP capsulaires mutés du Type III n'ont apparemment qu'une seule activité phénotypique: l'induction de la synthèse plus ou moins active de polysaccharide capsulaire du type III. La spécificité de la catalyse de tous ces TP est la même et il n'y a donc pas de raison d'admettre que l'agent capsulaire est composé de plusieurs éléments génétiques distincts.

2—Pour rendre compte des données décrites dans ce travail par une théorie analogue à la théorie de crossing-over, il serait nécessaire de postuler au moins 6 gènes liés. Or, les propriétés chimiques et physicochimiques connues de l'agent capsulaire normal ne cadrent pas avec une telle idée. Comme nous l'avons indiqué plus haut, celui-ci semble être composé uniquement de l'ADN. Les études les plus récentes de l'histochimie des chromosomes montrent que ceux-ci doivent leur structure à une association des protéines et des acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques. Aucune de ces trois classes de substances ne peut être considérée comme seule responsable de la structure linéaire. D'un autre côté, les extraits qui renferment l'agent capsulaire sont dépourvus de toute protéine décelable et ne renferment pas d'uracile, composé caractéristique de l'acide ribonucléique (7). De plus, la nature chimique de l'agent transformant capsulaire est indiquée clairement par son extrême sensibilité à l'action de la désoxyribonucléase cristallisée. La ribonucléase et la trypsine ne l'attaquent pas. L'agent capsulaire se déplace dans l'ultra-centrifuge et dans l'appareil de Tiselius avec les molécules d'acide désoxyribonucléique. Il n'y a aucune indication qu'il soit composé d'autres substances que l'acide désoxyribonucléique. Il est donc difficile de concilier les résultats de toutes les études chimique, physicochimique et biochimique de l'agent transformant avec l'idée qu'il est un fragment de chromosome. Il convient toutefois de remarquer que ces difficultés peuvent être dues au fait que nos connaissances chimiques de la structure linéaire des chromosomes sont fondées sur des études de la struc-

ture microscopique. A l'échelle macromoléculaire, nos connaissances des gènes sont nulles et c'est pourquoi les spéculations sur l'identité de l'agent capsulaire avec un ou plusieurs gènes ne peuvent pas être fructueuses.

On peut rendre compte des données relatives aux transformations allogènes en admettant que les agents mutés diffèrent entre eux par des régions altérées le long d'une structure linéaire. Il suffit de supposer:

1. Qu'une mutation du TP consiste en une altération localisée de sa structure.
2. Que l'agent capsulaire ait une polarité.
3. Que toute altération de sa structure ait pour effet une diminution de la sécrétion de polysaccharide capsulaire.
4. Que les différences dans la sécrétion du polysaccharide soient en rapport avec l'étendue de la région altérée.

On voit alors comment la combinaison de deux fragments d'agents capsulaires présentant des altérations dans des régions différentes peut permettre la reconstitution d'un TP normal; et comment les combinaisons de deux segments d'agents transformants à régions mutées qui se chevauchent ne peuvent conduire qu'à des reconstitutions partielles.

La figure 1 donne une représentation schématique de cette interprétation. La région altérée de l'agent SIII-1 est placée arbitrairement. Celle de l'agent SIII-1a est placée de façon à chevaucher la région mutée SIII-1, puisque l'interaction de ces deux agents ne donne que des reconstitutions partielles. Le TP SIII-1c est représenté avec une région mutée qui lui est particulière, parce qu'il donne des reconstitutions de l'agent normal avec les deux premiers. Enfin, l'agent SIII-2 est représenté avec une région mutée plus petite et en position différente des précédentes, parce qu'il donne des reconstitutions de l'agent normal avec n'importe lequel des autres agents mutés.

On notera que l'hypothèse présentée rend compte d'une caractéristique saillante du TP SIII-2a, celle notamment de ne pas donner de transformation allogène par action sur les souches SIII-1 et SIII-1a. Le TP SIII-2a possède, selon notre interprétation, la région mutée commune aux agents SIII-1 et SIII-1a, à l'interaction desquels il doit son origine. Il ne peut donc pas, en se recombinant avec un de ceux-ci, mener à la formation d'un TP qui ne présente pas cette région altérée. Notre hypothèse trouve en outre un appui important dans la rareté des transformations allogènes qui donnent naissance à des TP tels que SIII-2a. Ces transformations exigent en effet, selon notre schéma, des événements extrêmement précis, à savoir des recombinaisons qui éliminent les régions mutées particulières à chacun

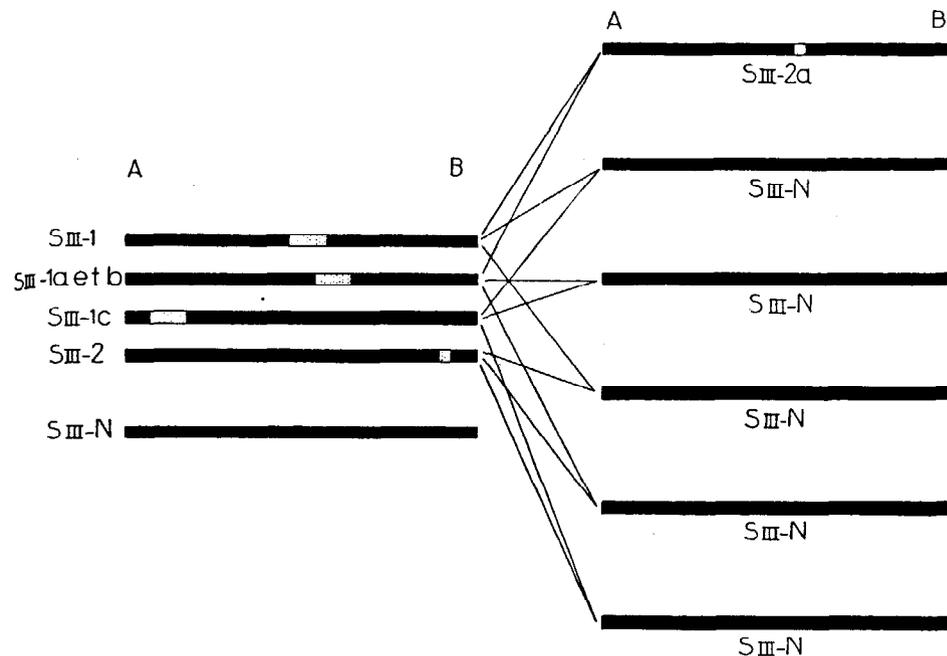


Fig. 1. Schéma des agents transformants mutés fondé sur les hypothèses décrites dans le texte. Les segments gris représentent les régions altérées par mutation spontanée. A gauche: agents transformants. A droite: restitution maxima à partir des fragments réunis de paires d'agents mutés.

des TP participants. Elles doivent donc être très rares et on a vu qu'elles le sont.

L'hypothèse formulée traduit en termes géométriques les données obtenues avec les divers agents capsulaires mutés. C'est peut-être un tort de construire une image géométrique, parce que, si l'agent capsulaire n'est qu'une molécule d'acide désoxyribonucléique, comme on peut le penser, il est peu probable qu'une simple image géométrique décrive l'état réel des choses. Mais, d'autre part, cette image suggère certaines expériences, telles que la recherche de pneumocoques contenant un agent à deux régions mutées, résultant aussi d'une transformation allogène et dont la démonstration serait un argument en faveur de l'interprétation proposée.

Toute spéculation mise à part, il est évident que l'agent capsulaire se comporte comme un élément composé de sub-unités. Faute de données plus précises sur la nature chimique et physicochimique de l'agent capsulaire,

et dans l'ignorance où nous sommes de ce qu'est l'autoreproduction d'une unité génétique, la définition de ces sub-unités est impossible à l'heure actuelle.

RÉSUMÉ

Les activités biologiques de cinq agents transformants capsulaires mutés du Type III ont été étudiées. Ces agents appartiennent à deux catégories: ceux (SIII-1) qui induisent la synthèse de l'antigène capsulaire du Type III en quantité insuffisante à la formation d'une capsule complète, et ceux (SIII-2) qui induisent la formation d'une capsule du Type III complète, mais encore de dimensions réduites par comparaison avec la capsule de pneumocoques normaux.

Chacun de ces agents isolés sous forme d'acide désoxyribonucléique induit, dans des bactéries sans capsule, la formation d'une capsule identique à celle du pneumocoque dont l'agent a été extrait. Ces inductions, tout à fait analogues aux transformations classiques, ont été appelées *transformations autogènes*.

On peut confronter deux agents mutés dans une seule bactérie, puisque la transformation des pneumocoques mutés de la catégorie SIII-1, qui secrètent très peu de polysaccharide, est encore possible. Dans ce cas, on observe généralement l'apparition de pneumocoques dont la synthèse capsulaire est à la fois plus active que celle de la souche traitée et celle de la souche qui a fourni l'agent transformant. Ces inductions ont été appelées *transformations allogènes*.

Le degré d'augmentation de la synthèse capsulaire, qui résulte d'une transformation allogène, dépend de la paire d'agents confrontés.

Les diverses transformations allogènes n'ont pas lieu avec la même facilité, certaines d'entre elles étant très rares.

Les transformations allogènes sont dues à la formation d'agents transformants dont l'activité, au point de vue de la synthèse capsulaire, est accrue. Cette activité atteint, dans certains cas, celle des agents normaux. L'étude des transformations allogènes montre que les mutations spontanées et indépendantes de l'agent capsulaire normal en agent SIII-1 ne sont pas nécessairement identiques. Parmi les quatre agents de cette catégorie étudiés, trois sont différents.

Au sein d'une population, un même agent muté peut induire simultanément des transformations autogènes et allogènes.

Un nouvel agent muté, résultat d'une transformation allogène, a été identifié. Cet agent, qui confère aux pneumocoques un phénotype sem-

blable au phénotype appelé SIII-2, présente des activités transformantes qui lui sont particulières et représente donc un nouvel agent qui n'a jamais été trouvé dans la nature.

La structure possible de l'agent capsulaire est discutée à la lumière des résultats observés.

LITTÉRATURE CITÉE

1. AVERY O. T., MACLEOD, C. M., et McCARTY, M., *J. Exptl. Med.*, **79**, 131 (1944).
2. BURNET, F. M., *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **13**, 2 (1950).
3. DELBRÜCK, M., et BAILEY, W. T., Jr., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **11**, 33 (1946).
4. GRIFFITH, F., *J. Hyg.*, **27**, 113 (1928).
5. HERSHEY, A. D., et ROTMAN, R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **34**, 89 (1948).
6. — *Genetics*, **34**, 44 (1949).
7. HOTCHKISS, R. D., *Colloques Intern. du C. N. R. S.*, **VIII**, 57 (1948).
8. LURIA, S. E., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **33**, 253 (1947).
9. — *Genetics*, **34**, 92 (1949).
10. MACLEOD, C. M., et KRAUSS, MARJORIE, *J. Exptl. Med.*, **86**, 439 (1947).
11. McCARTY, M., et AVERY, O. T., *J. Exptl. Med.*, **83**, 97 (1946).
12. McCARTY, M., TAYLOR, H. E., et AVERY, O. T., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **11**, 177 (1946).
13. SEVAG, M. G., *Biochem. Z.*, **273**, 419 (1934).
14. TAYLOR, H. E., *Colloques Intern. du C. N. R. S.*, **VIII**, 45 (1948).
15. — *J. Exptl. Med.*, **89**, 399 (1949).